

C201 電子伝達系(ETS)活性の湖沼生態系への適用

* 菅原 幸太郎・佐藤 泰哲・日野 修次 (山形大理)

中里 亮治 (茨城大)

【はじめに】

酸素は好気性生物の呼吸代謝に不可欠であると同時に、水中の酸化還元反応を支配している。また、好気的な水域で溶存酸素は、微生物生態系が関与する物質循環を理解する上で重要な因子である。酸素消費速度を測定する事は有機物をはじめとする代謝量を見積もる上でも重要であり、Packard *et al.*(1971)は細胞組織を破壊した懸濁溶液中の電子伝達活性を測定することにより、植物プランクトンの呼吸量を見積もれることを見出した。この測定法はテトラゾリウム塩(INT)の還元を介して電子伝達活性を測定するものであり、呼吸活性を簡便に測定でき、かつポテンシャルの活性を見積もれる方法として注目を集めてきた。現在では海洋を中心として様々な水環境中の微生物による呼吸速度が測定されている。

ETS 活性を測定する際、試水をろ過しフィルター上に微生物量を濃縮する操作が必要となるが、この操作の後の ETS 活性測定は、液体窒素で凍結保存後に分析している Aristegui(1995)を除いて、ろ過後直ちに分析を行っている。ETS 活性測定がより幅広い分野での研究で用いられるためには、より適切な保存法を開発する事が必要であるが、今回は液体窒素保存以外のより簡便な保存法を検討した。また、多くの研究者が ETS 測定の基礎としている Kenner and Ahmed(1975)の方法で用いられている電子伝達系の基質となる NADH、NADPH 濃度の妥当性を検討した。

【方法】

ETS 活性の測定法は、Kenner and Ahmed(1975)の方法を基本とした。試料は山形市の霞城公園の堀の水、及び裏磐梯湖沼群の小野川湖の湖水を用い、25mm のワットマン GF/F

グラスファイバーフィルターにろ過した。フィルターを 50mM リン酸バッファー(pH8.0)10ml 中で超音波破壊し、ホモジネートを 3500rpm で 15 分間遠心分離の後、上澄み 0.5ml を基質(コハク酸塩、NADH、NADPH)溶液 1.5ml、2.5mM の INT 溶液 0.5ml と混合し、4 時間インキュベーションした。その後還元によって生成した INT-formazan による 490nm の吸光度の増加を測定する。吸光度の変化から酸素消費速度への換算は、Rai(1984)の換算式を用いた。現場温度と分析時のインキュベーション温度が異なる場合には、Aristegui(1995)に従って Arrhenius の式を用い、現場の呼吸活性に換算した。

【結果】

試水をろ過し、フィルター試料の保存実験に関して、通常の冷凍庫保存(-20℃)では保存開始 1 日後で約 45%活性が低下したものの、液体窒素(-210℃)、ドライアイス(-78℃)で保存したサンプルの活性は 5 日後まで、ろ過直後の活性を維持していた(Table 1)。ドライアイスを用いる事により ETS 活性が測定時まで保持できる事により、さらに幅広い水域で呼吸活性の測定が可能になるであろう。

Kenner and Ahmed(1975)が用いている NADH、NADPH の基質濃度は従来、飽和状態にあると考えられていたが、小野川湖の湖水を試料とした基質濃度の比較実験より、Lineweaver-Burk プロットから求められる Michaelis 定数(K_m)は上記文献の基質濃度(0.645mM)と比較した場合(Fig.1)、従来の基質濃度では飽和状態にあるとはいえず、ポテンシャルの呼吸活性測定の為には基質濃度を高く設定する必要があると考えられた。

Table.1 試料の保存条件の検討 (霞城公園水)

ETS活性(%)		保存期間(day)				
凍結法	保存法	0	1	2	5	7
L	L	100	98	94	104	104
D	D	100	96	93	97	84
F	F	100	54	51	50	42
L	F	100	—	75	—	60
D	F	100	—	79	—	58

L:液体窒素, -210℃ D:ドライアイス, -78℃ F:冷凍庫, -20℃

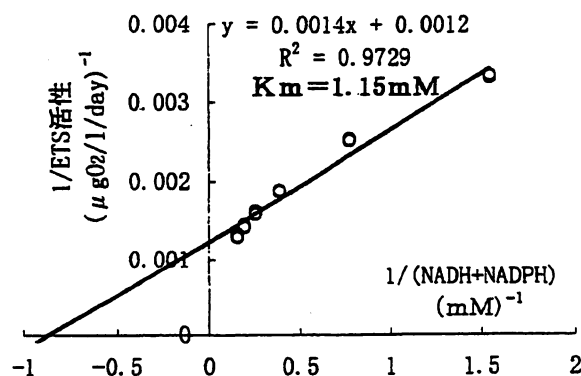


Fig.1 基質濃度からみた半飽和定数の検定 (小野川湖 表層水)

3. 研究実績

この章に収録した論文は、いずれ学術雑誌に原著等として発表される予定です。
特に引用を希望される方は、引用の可否について下記へお問い合わせ下さい。

問い合わせ先

名前：原 慶明

住所：990-8560 山形市小白川町1-4-12 山形大学理学部生物学科

電話：023-628-4610

Fax：023-628-4625

e-mail:hara@sci.kj.yamagata-u.ac.jp